

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/13925 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/737, 35/80, 35/56,
A61P 37/02, 43/00, 37/08 // C08B 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05489

(22) 国際出願日: 2000年8月17日 (17.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/234262 1999年8月20日 (20.08.1999) JP
特願2000/69223 2000年3月13日 (13.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 寶酒
造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto
(JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 富永隆生 (TOM-
INAGA, Takanari) [JP/JP]; 〒520-0242 滋賀県大津市
本堅田4-22-2-204 Shiga (JP). 山下周作 (YAMASHITA,

Syusaku) [JP/JP]; 〒520-2133 滋賀県大津市野郷原
1-14-3-202 Shiga (JP). 水谷滋利 (MIZUTANI, Shige-
toshi) [JP/JP]; 〒521-1322 滋賀県蒲生郡安土町宮津
1-86 Shiga (JP). 佐川裕章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP];
〒525-0025 滋賀県草津市西沢川二丁目6-32 Shiga (JP).
加藤郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京
都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒
540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大
手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(続乗有)

(54) Title: REMEDIES

(54) 発明の名称: 治療剤

(57) Abstract: Remedies or preventives for diseases with a need for the regulation of the production of cytokines, diseases with a need for the production of nitrogen monoxide or allergic diseases characterized by containing as the active ingredient fucoidan and/or its decomposition product; and foods, drinks or feeds for regulating the production of cytokines, foods, drinks or feeds for inducing the production of nitrogen monoxide, antiallergic foods, drinks or feeds, etc. containing fucoidan and/or its decomposition product.

(57) 要約:

本発明は、フコイダン及び／又はその分解物を有効成分として含有することを特徴とするサイトカイン類産生調節を要する疾患、一酸化窒素産生を要する疾患、又はアレルギー性疾患の治療剤又は予防剤、並びにフコイダン及び／又はその分解物を含有してなるサイトカイン類産生調節用食品、飲料又は飼料、一酸化窒素産生誘導用食品、飲料又は飼料、或いは抗アレルギー用食品、飲料又は飼料などに関する。

WO 01/13925 A1

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/737

A61K 35/80 A61K 35/56

A61P 37/02 A61P 43/00

A61P 37/08

//C08B37/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814678.0

[43] 公开日 2002 年 11 月 27 日

[11] 公开号 CN 1382055A

[22] 申请日 2000.8.17 [21] 申请号 00814678.0

[30] 优先权

[32] 1999.8.20 [33] JP [31] 234262/99

[32] 2000.3.13 [33] JP [31] 69223/00

[86] 国际申请 PCT/JP00/05489 2000.8.17

[87] 国际公布 WO01/13925 日 2001.3.1

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.22

[71] 申请人 宝酒造株式会社

地址 日本京都府

[72] 发明人 富永隆生 山下周作 水谷滋利

佐川裕章

加藤郁之进

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹 雯 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图 13 页

[54] 发明名称 治疗剂

[57] 摘要

本发明涉及需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的 治疗剂或预防剂,其特征 在于含有岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分。还涉及含有岩藻依聚糖和/或其分解产物的调节细胞因子生成用食品、饮料或饲料、诱导一氧化氮产生用食品、饮料或饲料或者抗变态反应用食品、饮料或饲料。

ISSN 1008-4274

1. 一种需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的治疗剂或预防剂，其特征在于，含有岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分。

5 2. 如权利要求 1 所述的治疗剂或预防剂，岩藻依聚糖源于藻类或源于棘皮动物。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的治疗剂或预防剂，细胞因子为白介素类或干扰素类。

10 4. 如权利要求 3 所述的治疗剂或预防剂，干扰素类为干扰素- γ 。

5. 如权利要求 3 所述的治疗剂或预防剂，白介素类为白介素-12。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的治疗剂或预防剂，变应性疾病为需要抑制 IgE 产生的疾病。

15 7. 如权利要求 1~6 中任意一项所述的治疗剂或预防剂，为口服治疗剂或口服预防剂。

8. 一种调节细胞因子生成用食品、饮料或饲料、诱导一氧化氮产生用食品、饮料或饲料或者抗变态反应用食品、饮料或饲料，是含有岩藻依聚糖和/或其分解产物的调节细胞因子生成用、诱导一氧化氮产生用或者抗变态反应用食品、饮料或饲料。

20 9. 如权利要求 8 所述的食物、饮料或饲料，岩藻依聚糖源于藻类或源于棘皮动物。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的食物、饮料或饲料，细胞因子为白介素类或干扰素类。

25 11. 如权利要求 10 所述的食物、饮料或饲料，干扰素类为干扰素- γ 。

12. 如权利要求 10 所述的食物、饮料或饲料，白介素类为白介素-12。

30 13. 如权利要求 8 或 9 所述的食物、饮料或饲料，抗变态反应用食品、饮料或饲料为抑制 IgE 产生用食品、饮料或饲料。

14. 岩藻依聚糖和/或其分解产物在治疗或预防需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病中的用途。

15. 岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的治疗剂或预防剂中的用途。

16. 一种治疗或预防需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的方法，使用岩藻依聚糖和/或其分解产物。

17. 一种细胞因子生成调节剂、一氧化氮产生诱导剂、抗变态反应剂或 IgE 产生抑制剂，含有岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分。

18. 岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备细胞因子生成调节剂、一氧化氮产生诱导剂、抗变态反应剂或 IgE 产生抑制剂中的用途。

19. 岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备调节细胞因子生成用食品、饮料或饲料、诱导一氧化氮产生用食品、饮料或饲料或者抗变态反应用食品、饮料或饲料中的用途。

20. 一种细胞因子生成调节方法、一氧化氮产生诱导方法、变态反应抑制方法或 IgE 产生抑制方法，使用岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分。

21. 岩藻依聚糖和/或其分解产物在调节细胞因子生成、诱导一氧化氮产生、抑制变态反应或抑制 IgE 产生中的用途。

治疗剂

技术领域

5 本发明涉及源于水生生物的生理活性物质作为药物、食品、饮料或饲料的用途。

背景技术

作为源于水生生物的生理活性物质，已知岩藻依聚糖。这种岩藻依聚糖是含在藻类、棘皮动物等中的含硫酸化岩藻糖的多糖，含有硫酸化岩藻糖作为构成糖。

作为岩藻依聚糖的生理作用，已知癌增殖抑制活性、癌转移抑制活性、抗凝血活性、抗病毒活性等，期待开发作为药品的用途。

发明公开

本发明在于发现岩藻依聚糖的新型生理作用，其目的在于提供一种利用岩藻依聚糖的细胞因子生成调节作用等的药物、食品、饮料或饲料。另外，在本说明书中，有时将本发明的治疗剂或预防剂称为药物。

如果概括地描述本发明，本发明的第1项发明涉及需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的
20 治疗剂或预防剂，其特征在于，含有岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分。

本发明的第2项发明涉及调节细胞因子生成用食品、饮料或饲料、诱导一氧化氮产生用食品、饮料或饲料或者抗变态反应用食品、饮料或饲料，其特征在于，含有岩藻依聚糖和/或其分解产物。

25 另外，作为本发明的一种方式，涉及岩藻依聚糖和/或其分解产物在治疗或预防需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病中的用途；岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的
30 治疗剂或预防剂中的用途；或者使用岩藻依聚糖和/或其分解产物治疗或预防需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的方法。

而且，作为本发明的一种方式，涉及含有岩藻依聚糖和/或其分

解产物作为有效成分的细胞因子生成调节剂、一氧化氮产生诱导剂、抗变态反应剂或 IgE 产生抑制剂。

而且，作为本发明的一种方式，涉及岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备细胞因子生成调节剂、一氧化氮产生诱导剂、抗变态反应剂或 IgE 产生抑制剂中的用途。

而且，作为本发明的一种方式，涉及岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备调节细胞因子生成用食品、饮料或饲料、诱导一氧化氮产生用食品、饮料或饲料或者抗变态反应用食品、饮料或饲料中的用途。

而且，作为本发明的一种方式，涉及使用岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的细胞因子生成调节方法、一氧化氮产生诱导方法、变态反应抑制方法或 IgE 产生抑制方法。

而且，作为本发明的一种方式，涉及岩藻依聚糖和/或其分解产物在调节细胞因子生成、诱导一氧化氮产生、抑制变态反应或抑制 IgE 产生中的用途。

作为本发明更优选的方式，岩藻依聚糖和/或其分解产物对于调节抗原致敏时，例如抗原呈递细胞和 T 细胞之间的抗原呈递时的细胞因子生成具有显著效果。另外，岩藻依聚糖和/或其分解产物对于治疗抗原致敏后的变应性疾病，特别是抑制抗原致敏后的抗原特异性 IgE 产生具有显著效果。另外，本发明中，细胞因子生成调节剂包括通过增强、促进细胞因子类的生成等，调节细胞因子的产量。

因此，作为本发明的一种方式，涉及抗原致敏时需要调节细胞因子生成的疾病或抗原致敏后的变应性疾病的的治疗剂或预防剂，其特征在于含有岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分。

另外，本发明的一种方式涉及抗原致敏时调节细胞因子产生用食品，饮料或饲料，或抗原致敏后的抗变态反应用食品、饮料或饲料，其特征在于含有岩藻依聚糖和/或其分解产物。

另外，作为本发明的一种方式，涉及岩藻依聚糖和/或其分解产物在治疗或预防抗原致敏时需要调节细胞因子生成的疾病或抗原致敏后的变应性疾病中的用途；岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备抗原致敏时需要调节细胞因子生成的疾病或抗原致敏后的变应性疾病的的治疗剂或预防剂中的用途；或者使用岩藻依聚糖和/或其分解产物

治疗或预防抗原致敏时需要调节细胞因子生成的疾病或抗原致敏后的变应性疾病的方法。

而且，作为本发明的一种方式，涉及含有岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的抗原致敏时的细胞因子生成调节剂、抗原致敏后的抗变态反应剂或 IgE 产生抑制剂。

而且，作为本发明的一种方式，涉及岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备抗原致敏时的细胞因子生成调节剂、抗原致敏后的抗变态反应剂或抗原致敏后的 IgE 产生抑制剂中的用途。

而且，作为本发明的一种方式，涉及岩藻依聚糖和/或其分解产物在制备调节抗原致敏时的细胞因子生成用食品、饮料或饲料、或者抗原致敏后的抗变态反应用食品、饮料或饲料中的用途。

而且，作为本发明的一种方式，涉及使用岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的抗原致敏时的细胞因子生成调节方法、抗原致敏后的变态反应抑制方法或抗原致敏后的 IgE 产生抑制方法。

而且，作为本发明的一种方式，涉及岩藻依聚糖和/或其分解产物在调节抗原致敏时的细胞因子生成、抑制抗原致敏后的变态反应或抑制抗原致敏后的 IgE 产生中的用途。

本发明中使用的岩藻依聚糖没有特别的限定，优选例如源于藻类的岩藻依聚糖或源于棘皮动物的岩藻依聚糖。

另外，作为岩藻依聚糖的分解物，可使用例如岩藻依聚糖的酸分解物，岩藻依聚糖的酶分解物。

作为本发明中使用的岩藻依聚糖、岩藻依聚糖的分解产物，例如岩藻依聚糖的酸分解产物、岩藻依聚糖的酶分解产物，只要是显示细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、或抗变态反应作用，例如 IgE 产生抑制作用等，没有特别的限定，能够以上述作用等作为指标适当配制。

另外，本说明书中所说的细胞因子特别是指岩藻依聚糖或其分解产物能够显示生成调节作用的细胞因子，例如白介素类（如白介素-12）、干扰素类（如干扰素- γ ）。

而且，抗变态反应作用是指岩藻依聚糖或其分解产物能够显示的变态反应抑制作用，例如 IgE 产生抑制作用。

附图说明

图 1 是表示源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 DEAE-Cellulofine A-800 柱洗脱曲线的图。

图 2 是表示添加 7-12SFd-F 培养时培养基中的 NO_2^- 浓度的图。

图 3 是表示添加级分 I 培养时培养基中的 NO_2^- 浓度的图。

5 图 4 是表示添加级分 II 培养时培养基中的 NO_2^- 浓度的图。

图 5 是表示添加级分 III 培养时培养基中的 NO_2^- 浓度的图。

图 6 是表示添加阳性对照的 LPS 培养时培养基中的 NO_2^- 浓度的图。

10 图 7 是表示岩藻依聚糖及其分解产物的 $\text{IFN}-\gamma$ 产生诱导作用的图。

图 8 是表示岩藻依聚糖及其分解产物的 IL-12 产生诱导作用的图。

图 9 是表示源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖对小鼠脾脏淋巴细胞的细胞毒性免疫增强作用的图。

15 图 10 是表示 G-岩藻依聚糖的 $\text{IFN}-\gamma$ 产生诱导作用的图。

图 11 是表示 G-岩藻依聚糖的 IL-12 产生诱导作用的图。

图 12 表示各种抗体对岩藻依聚糖的 $\text{IFN}-\gamma$ 或 IL-12 产生诱导作用的作用。

20 图 13 是表示各种岩藻依聚糖的 $\text{IFN}-\gamma$ 产生诱导作用的图。
发明的最佳实施方式

本发明使用的岩藻依聚糖是含有硫酸化岩藻糖作为构成成分的多糖，只要具有细胞因子类生成调节作用，例如抗原呈递细胞 (APC) 和 T 细胞之间的抗原呈递反应时的干扰素- γ 产生调节作用、白介素-12 产生调节作用；一氧化氮产生诱导作用；或抗变态反应作用，
25 例如 IgE 产生抑制作用，并没有特别的限定。例如，藻类中的 *Kjellmaniella crassifolia*、*Kjellmaniella gyrata*、墨角藻属 (*Fucus*)、冲绳海藻 (*Cladosiphon okamuranus*)、裙带菜属 (*Undaria*)、昆布 (*Ecklonia kurome*)、茶色海藻 (*Eisenia bicyclis*)、褐藻 (*Ecklonia cava*)、巨藻 (*Giant kelp*)、黑巨藻
30 (*Lessonia nigrescence*)、泡叶藻 (*Ascophyllum nodosum*) 等海带目 (*Laminariales*)、索藻目 (*Chordariales*)、岩藻目 (*Fucales*) 海藻富含适用于本发明的岩藻依聚糖，适合作为原料。另外，也可

以使用源于棘皮动物，例如海参、海胆、海星等的岩藻依聚糖。

这些岩藻依聚糖的制备可以分别按照公知的方法制备，在本发明中可以使用纯化品或含有该岩藻依聚糖的物质等。

例如由 *Kjellmaniella crassifolia* 制备岩藻依聚糖，该岩藻依聚糖可以进一步分离成含有葡萄糖醛酸的岩藻依聚糖（称为 U-岩藻依聚糖）和不含葡萄糖醛酸的岩藻依聚糖（称为 F-岩藻依聚糖）。这些岩藻依聚糖可以用作本发明的治疗剂或预防剂等的有效成分。另外，也可以由 *Kjellmaniella crassifolia* 制备硫酸化岩藻半乳聚糖（称为 G-岩藻依聚糖）使用。

U-岩藻依聚糖和 F-岩藻依聚糖在由 *Kjellmaniella crassifolia* 制备岩藻依聚糖后，用阴离子交换树脂、表面活性剂等分离。源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的 U-岩藻依聚糖和 F-岩藻依聚糖的存在比按重量比约为 1:2，U-岩藻依聚糖含有岩藻糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖醛酸等，硫酸含量为约 20 重量%，F-岩藻依聚糖含有岩藻糖和半乳糖，硫酸含量为约 50 重量%，两种物质的分子量均以约 20 万为中心分布（第 18 次糖质讨论会要旨集，第 159 页，1996 年）。

例如将由 *Kjellmaniella crassifolia* 制备的岩藻依聚糖溶液施于 DEAE-Cellulofine A-800 柱上后，用含有 NaCl 的缓冲液按浓度梯度法进行洗脱，可以分离 U-岩藻依聚糖和 F-岩藻依聚糖。图 1 表示其中的一个实例。也就是说，图 1 是表示 U-岩藻依聚糖和 F-岩藻依聚糖的分离的图，图中前峰为 U-岩藻依聚糖，后峰为 F-岩藻依聚糖。

另外，通过将源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖用交替单胞菌属（*Alteromonas* sp.）SN-1009（FERM BP-5747）产生的 F-岩藻依聚糖特异分解酶以及黄杆菌属（*Flavobacterium* sp.）SA-0082（FERM BP-5402）产生的 U-岩藻依聚糖特异分解酶分解，除去分解产物，可以纯化上述 G-岩藻依聚糖。

另外，源于墨角藻属的岩藻依聚糖、源于 *Cladosiphon okamuranus* 的岩藻依聚糖、源于裙带菜属的岩藻依聚糖、源于裙带菜（*Undaria pinnatifida*）的岩藻依聚糖也可以按照公知的方法制备，用于本发明。

本发明中适用的源于棘皮动物的岩藻依聚糖，例如特开平 4-91027 号公报中记载的海参中含有的岩藻依聚糖，可以按照该公报中记载的方法由海参制备该岩藻依聚糖。

另外，本发明中使用的具有细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用的岩藻依聚糖分解产物可以按照酶学方法、化学方法、物理方法等公知的方法，选择具有所需的细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用的分解产物后使用。

作为所述岩藻依聚糖的分解产物的制备方法，例如有酸分解法，可以通过对该岩藻依聚糖进行酸分解，制备具有细胞因子生成调节作用、免疫激活作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用的分解产物。

上述酸分解法的酸分解条件只要是生成具有细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用的分解产物（以下称为本发明的分解产物）的条件即可，没有特别的限定。

例如通过将岩藻依聚糖溶解或悬浊于酸中，使之反应，生成本发明的分解产物。另外，通过在反应时进行加热，可以缩短生成本发明的分解产物所必需的时间。

溶解或悬浊岩藻依聚糖的酸的种类没有特别的限定，可以使用盐酸、硫酸、硝酸等无机酸，枸橼酸、甲酸、醋酸、乳酸、抗坏血酸等有机酸，以及阳离子交换树脂、阳离子交换纤维、阳离子交换膜等固体酸。

酸的浓度没有特别的限定，优选以 0.0001~5N，更优选以 0.01~1N 的浓度使用。另外，反应温度也没有特别的限定，优选设定为 0~200℃，更优选 20~130℃。

另外，反应时间也没有特别的限定，优选设定为数秒~数日。酸的种类和浓度、反应温度和反应时间最好根据本发明分解产物的产量、分解产物的聚合度适当选择。另外，制备本发明的分解产物时，优选使用枸橼酸、乳酸、苹果酸等有机酸，酸的浓度在 10mM~数 M 的范围内选择，加热温度在 50~110℃，更优选在 70~95℃的范围内选择，加热时间在数分钟~24 小时的范围内选择，可以制备本发明的分解产物。作为岩藻依聚糖的酸分解产物，例如源于

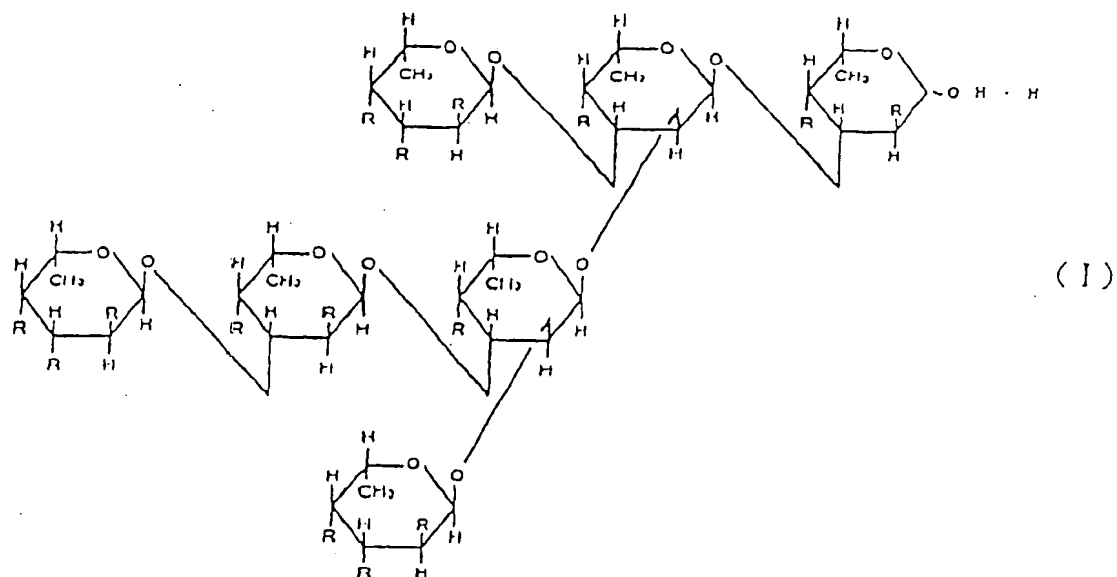
Kjellmaniella crassifolia 的岩藻依聚糖的酸分解产物, 该分解产物可以作为具有细胞因子生成调节作用, 特别是 APC 和 T 细胞之间的抗原呈递反应时的干扰素- γ 产生调节作用, 一氧化氮产生诱导作用以及抗变态反应作用的强效新生理功能的食物纤维使用。

5 本发明的分解产物能够以细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用为指标进行分级, 例如可以按照凝胶过滤法、采用分子量分级膜的分级法等对酸分解产物进一步进行分子量分级。

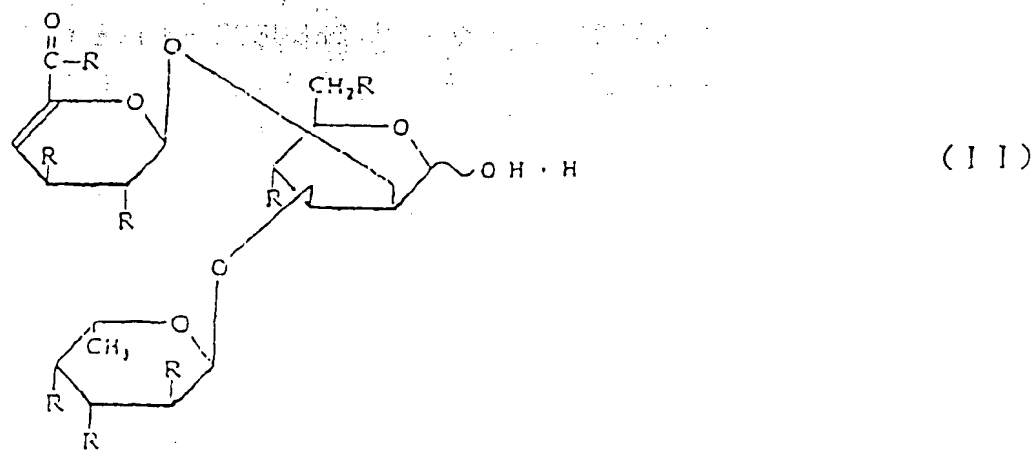
10 作为凝胶过滤法的实例, 使用 Cellulofine GCL-300, 可以制备例如分子量大于 25000、分子量 25000~大于 10000、分子量 10000~大于 5000、分子量 5000 以下等任意的分子量级分, 使用 Cellulofine GCL-25, 可以将分子量为 5000 以下的级分制备成分子量 5000~大于 3000、分子量 3000~大于 2000、分子量 2000~大于 1000、分子量 1000~大于 500、分子量 500 以下等任意的分子量级分。

15 另外, 也可以使用超滤膜进行工业分子量分级, 例如可以通过使用 DAICEL 公司生产的 FE10-FUS0382 制备分子量 30000 以下的级分, 或者通过使用 DAICEL 公司生产的 FE-FUS-T653 制备分子量 6000 以下的级分。也可以进一步使用纳米滤膜得到分子量 500 以下的级分, 可以通过将这些凝胶过滤法、分子量分级法组合, 制备任意的分子量级分。

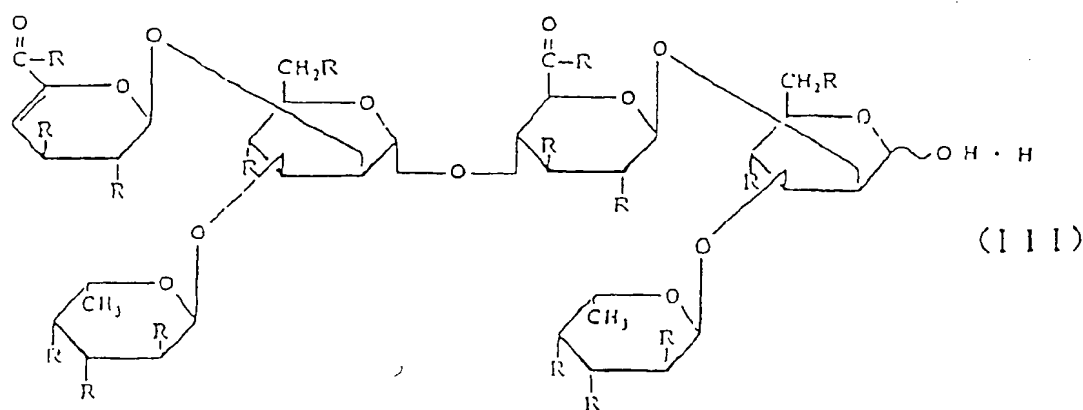
20 作为本发明中能够使用的具有细胞因子生产调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用的岩藻依聚糖分解产物, 例如下述式 (I)~式 (IV) 表示的化合物, 这些化合物可以按照国际公开第 97/26896 号说明书、国际申请号 PCT/JP99/00606 号说明书、国际申请号 PCT/JP00/00965 号说明书中记载的方法制备。另外, 作为本发明的岩藻依聚糖分解产物, 也包括国际公开第 97/26896 号、国际申请号 PCT/JP99/00606 号说明书、国际申请号 PCT/JP00/00965 号说明书中记载的岩藻依聚糖分解产物。另外, 具有式 (I) 所示化合物的重复结构的岩藻依聚糖以及低聚糖也可以适用于本发明。



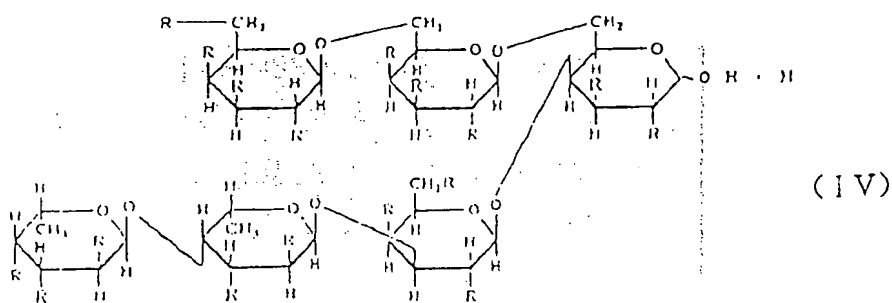
(式中, R 为 OH 或 OSO₃H.)



(式中, R 为 OH 或 OSO₃H.)



(式中, R 为 OH 或 OSO₃H.)



(式中, R 为 OH 或 OSO₃H.)

另外, 作为式 (I) 所示化合物的实例, 例如下述式 (V) 表示的化合物。

式 (I) 表示的化合物例如可以通过用交替单胞菌属 SN-1009 (FERM BP-5747) 产生的内切型硫酸化多糖分解酶 (F-岩藻依聚糖特异分解酶) 处理上述 F-岩藻依聚糖, 由其分解产物纯化得到。关于该化合物中硫酸酯基的含量、部位, 可以由其分解产物中纯化得到任意的物质。另外, 该分解产物中也含有式 (I) 所示化合物的聚合物, 可以根据目的进行分离、纯化。

式 (II) 表示的化合物和式 (III) 表示的化合物分别可以通过例如用黄杆菌属 SA-0082 (FERM BP-5402) 产生的内切型硫酸化

多糖分解酶(U-岩藻依聚糖特异分解酶)处理上述U-岩藻依聚糖,由其分解产物纯化得到。针对该化合物中硫酸酯基的含量、部位,可以由其分解产物中纯化得到任意的物质。另外,该分解产物中也含有以式(II)所示化合物中没有双键的化合物作为基本骨架的聚合物,可以根据目的进行分离、纯化。

式(IV)表示的化合物例如可以通过使从黄杆菌属SA-0082(FERM BP-5402)得到的特异地分解G-岩藻依聚糖的内切型硫酸化多糖分解酶(G-岩藻依聚糖特异分解酶)作用于G-岩藻依聚糖,制备该G-岩藻依聚糖的分解产物,由该分解产物纯化得到。针对该化合物中硫酸酯基的含量、部位,可以由其分解产物中纯化得到任意的物质。另外,该分解产物中也含有以式(IV)所示化合物为基本骨架的聚合物,可以根据目的进行分离、纯化。

另外,岩藻依聚糖或其分解产物的细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用或抗变态反应作用按照例如后述实施例1、2、7和8记载的方法检定。作为被测对象的岩藻依聚糖或其分解产物显示所述作用时,以其作为指标选择本发明中可以使用的岩藻依聚糖或其分解产物。

在本发明中,能够通过岩藻依聚糖或其分解产物调节生成的细胞因子没有特别的限定,例如白介素(IL)-1~18、干扰素(IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、淋巴毒素、肿瘤坏死因子(TNF)、干细胞因子(SCF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)等。

这些细胞因子包括以延迟型过敏反应或靶细胞障碍为主与各种细胞性免疫反应的表达或调节有关的细胞因子(IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、TNF- β 等)、在抗体产生机理中与其调节功能有关的细胞因子(IL-2、IL-4、IL-5、IL-6等)、对肿瘤细胞直接显示增殖抑制作用或破坏作用的细胞因子(TNF- α 、TNF- β 、IFN等)、促进骨髓中的造血干细胞或前体细胞增殖、分化的细胞因子(IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、GM-CSF、G-CSF、M-CSF等)、与炎症反应有关的细胞因子(IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 、TNF- β 、IFN等)、与变态反应有关的细胞因子(IL-3、IL-4、IL-5等)、增强NK细胞活性的细胞因子(IL-12)等。另外,

本发明中使用的岩藻依聚糖和/或其分解产物具有的细胞因子生成调节作用是指仅仅在存在病毒感染或癌等体内应排除的抗原，必须增强细胞性免疫时，能够选择性产生的细胞因子生成调节作用，例如 IFN- γ 、IL-12 的产生诱导作用或者其产生增强作用或产生促进作用。因此，该岩藻依聚糖和/或其分解产物不会导致不必要状态下的免疫系统活化或增强，因而不会引起变态反应症状、自身免疫疾病等疾病，是非常安全而且有效的成分。另外，该岩藻依聚糖和/或其分解产物也可以增强细胞毒性免疫，例如增强淋巴细胞的细胞毒性。

因此，使用岩藻依聚糖和/或其分解产物，通过调节这些细胞因子的生成，能够治疗或预防需要调节细胞因子生成的疾病，例如癌等需要表达或调节细胞性免疫反应的疾病，自身免疫疾病等需要调节抗体产生的疾病，贫血、糖尿病等需要细胞分化的疾病，败血症性休克、炎症性肠疾病、慢性关节风湿、多发性硬化、葡萄膜炎等需要抑制炎症的疾病。

本发明中使用的岩藻依聚糖及其分解产物具有细胞因子生成调节作用，能够以这些化合物作为有效成分制备需要调节细胞因子生成的上述疾病的治疗剂或预防剂。

另外，本发明中使用的岩藻依聚糖及其分解产物具有一氧化氮产生诱导作用，使用这些化合物作为有效成分，能够治疗或预防需要产生一氧化氮的疾病，例如需要松弛血管平滑肌、抑制血小板、粒细胞和单核细胞向血管壁粘附、阻止分泌性平滑肌细胞增殖等的动脉硬化。另外，该岩藻依聚糖及其分解产物也可以通过上述作用发挥免疫激活效果。另外，一氧化氮产生诱导作用也包括诱导增强作用或诱导促进作用。

而且，本发明中使用的岩藻依聚糖及其分解产物具有抗变态反应作用，例如 IgE 产生抑制作用，使用这些化合物作为有效成分，能够治疗或预防变应性疾病，例如由于产生 IgE 介导的或恶化的症状，例如 IgE 引起的变应性疾病，如支气管哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎、变应性结膜炎、荨麻疹、过敏性休克等。

另外，上述岩藻依聚糖的特定级分，特别是 F-岩藻依聚糖、U-岩藻依聚糖、G-岩藻依聚糖，是基本结构初次确定的岩藻依聚糖级分，在这一点上，使用特异地作用于各级分的酶制备的各种分解

产物，特别是其分解产物的级分，例如式(I)~(IV)等化合物是分子量较岩藻依聚糖低的分子；而且与岩藻依聚糖具有同等的生理活性，在这一点上，与结构、组成、物性不明确的简单分离得到的岩藻依聚糖或含有岩藻依聚糖的物质相比显著优良。

5 在本发明中，提供一种需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的的治疗剂或预防剂，其中含有上述岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分。

特别是作为本发明的需要调节细胞因子生成的疾病的治疗剂或预防剂，从有效性的观点来看，优选需要调节白介素类或干扰素类
10 生成的疾病的治疗剂或预防剂，更优选需要调节干扰素- γ 或白介素-12生成的疾病的治疗剂或预防剂。另外，本发明的变应性疾病的
治疗剂或预防剂具有抗原致敏后的IgE产生抑制作用，且通过口服
给药具有抗原致敏后的IgE产生抑制作用，在这一点上，是非常有
用的抗变态反应剂。而且，本发明的变应性疾病的的治疗剂或预防剂
15 能够通过口服给药抑制特别是在花粉病样由抗原致敏产生的症状中的
抗原特异性IgE产生，在这一点上显著优良。因此，作为变应性
疾病的治疗剂或预防剂，优选需要抑制IgE产生的疾病的治疗剂或
预防剂。

本发明的治疗剂或预防剂以岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有
20 效成分，通过将其与公知的药用载体组合制成制剂得到。该制剂的
制备一般通过将岩藻依聚糖和/或其分解产物与药学上允许的液状或
固体状的载体配合，并根据需要加入溶剂、分散剂、乳化剂、缓冲
剂、稳定剂、赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂等，制成片剂、颗
粒剂、散剂、粉末剂、胶囊剂等固体制剂、溶液剂、悬浊剂、乳剂
25 等液体制剂进行。另外，也可以制成能够在使用之前添加适当的载
体形成液状的干燥品。

药用载体可以根据本发明的治疗剂或预防剂的给药方式和剂型
适当选择。

口服剂の場合，可以利用例如淀粉、乳糖、白糖、甘露醇、羧
30 甲基纤维素、玉米淀粉、无机盐等。另外，配制口服剂时，也可以
进一步配合粘结剂、崩解剂、表面活性剂、润滑剂、助流剂、矫味
剂、着色剂、香料等。

另一方面，非口服剂的场合，可以按照常规方法使本发明的有效成分岩藻依聚糖和/或其分解产物溶解或悬浊于作为稀释剂的注射用蒸馏水、生理盐水、葡萄糖水溶液、注射用植物油、芝麻油、花生油、大豆油、玉米油、丙二醇、聚乙二醇等中，根据需要加入杀
5 菌剂、稳定剂、等渗剂、止痛剂等进行配制。

本发明的治疗剂或预防剂可以根据制剂形态采用适当的给药途径给药。另外，给药方法也没有特别的限定，可以内用、外用和注射。注射剂可以在静脉内、肌肉内、皮下、真皮内等给药，外用剂也包括栓剂等。另外，所述治疗剂或预防剂从其有效性的观点来看，
10 优选口服用治疗剂或口服用预防剂。

本发明的治疗剂或预防剂的给药量并不是一定的，可以根据其制剂形态、给药方法、使用目的及其适用的患者年龄、体重、症状适当设定，一般制剂中含有的岩藻依聚糖和/或其分解产物的量优选
15 成人每天 0.1 ~ 2000mg/kg。因此，本发明的治疗剂或预防剂中岩藻依聚糖和/或其分解产物的含量最好适当决定，使得通过给予该治疗剂或预防剂至少能够在上述范围内给予岩藻依聚糖和/或其分解产物。另外，给药量根据种种条件变化，因此有时采用低于上述给药量的量就足够，或者有时必须超过上述范围。本发明的治疗剂或预
20 防剂可以直接口服给药，也可以添加到任意的饮食品中使之日常摄取。另外，也可以使用岩藻依聚糖和/或其分解产物作为调节细胞因子生成用饮食品或饲料、诱导一氧化氮产生用饮食品或饲料、抗变态反应用饮食品或饲料的原料。

另外，作为本发明的一种方式，提供一种岩藻依聚糖和/或其分解产物在治疗或预防需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化
25 氮的疾病或变应性疾病中的用途；或者使用岩藻依聚糖和/或其分解产物治疗或预防需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病的方法。

为了治疗或预防需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病或变应性疾病，最好按上述例举的范围给予岩藻依聚糖
30 和/或其分解产物，例如适当给予本发明的治疗剂或预防剂。

而且，作为本发明的一种方式，提供含有岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的细胞因子生成调节剂，例如 IFN- γ 生成调节

剂、IL-12 生成调节剂；一氧化氮产生诱导剂；或抗变态反应剂，例如 IgE 产生抑制剂。这些药物可以按照上述治疗剂或预防剂制备。例如细胞因子生成调节剂对研究细胞因子的功能、筛选与细胞因子有关的疾病用药物是有用的。这些药物的剂型、用量等只要可以相应于各种用途得到该药物发挥的所需效果即可，没有特别的限定。另外，对于上述例举的疾病等也可以适用。

而且，作为本发明的一种方式，提供岩藻依聚糖和/或其分解产物在调节细胞因子生成、诱导一氧化氮产生、抑制变态反应或抑制 IgE 产生中的用途；或使用岩藻依聚糖和/或其分解产物的细胞因子生成调节方法、一氧化氮产生诱导方法、变态反应抑制方法或 IgE 产生抑制方法。

为了调节细胞因子生成、诱导一氧化氮产生、抑制变态反应或抑制 IgE 产生，可以使用上述细胞因子生成调节剂、一氧化氮产生诱导剂等以根据各种用途获得所需的效果。

以下说明本发明使用的岩藻依聚糖或其分解产物的推定药理作用。

关于从淋巴细胞诱导产生 IFN- γ ，已知 ConA 等促细胞分裂剂对 T 细胞直接刺激产生的诱导以及抗原致敏时抗原呈递细胞 (APC) 和 T 细胞的细胞间相互作用产生的诱导。前者是促细胞分裂剂对 T 细胞受体直接结合产生的诱导，后者是 APC 与 T 细胞各受体的刺激以及通过该刺激由 APC 产生的 IL-12 引起的诱导。作为与 IL-12 产生诱导有关的受体反应，除 T 细胞受体 (TCR) / 主要组织相容复合体 (MHC) 以外，作为副刺激，已知 T 细胞侧的 CD40L 和 APC 侧的 CD40、以及 T 细胞侧的 CD28 和 APC 侧的 B7 的各种反应。

以前，有报道称源于海带 (*Laminaria japonica*) 的岩藻依聚糖诱导源于正常小鼠的脾脏淋巴细胞产生 IFN- γ ，增强 NK 细胞的活化 (中国海洋药物杂志, 1995 第 3 期, 9~13)，但这是对处于静止期的原初 T 细胞直接刺激产生的诱导。

另一方面，关于这次本发明人等确认的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖及其级分的 IFN- γ 产生诱导作用，如实施例所示，确认没有直接刺激淋巴细胞或刺激同种异源抗原时的诱导作用，仅在致敏淋巴细胞的抗原刺激下促进 IFN- γ 产生。而且，

确认这时诱导 IL-12 产生。这种抗原呈递反应时的 IFN- γ 产生诱导作用在由抗 IL-12 抗体中和产生的 IL-12 时抑制约 50%，在通过抗 CD40 抗体和抗 CD28 抗体抑制这些受体反应时则完全抑制。因此，关于来源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖及其级分的 IFN- γ 产生诱导作用机理，推测可能是由于在抗原呈递反应时对 APC 作用促进 IL-12 产生引起的，以及对由于 APC 细胞和 T 细胞的相互作用处于活化状态的 T 细胞作用诱导的。

发现对静止期 T 细胞的直接诱导作用的上述报道中记载的岩藻依聚糖和本发明中使用的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖不同，其结果显示完全不同的作用。

另外，在使用抗原呈递细胞之一的巨噬细胞株的系统中，岩藻依聚糖及其分解产物诱导一氧化氮产生，并基于这种诱导显示免疫激活效果，但是即使在这种系统中，也未见岩藻依聚糖及其分解产物诱导 IFN- γ 产生，认为本发明中使用的岩藻依聚糖及其分解产物没有直接诱导 IFN- γ 产生的活性，促进一氧化氮产生与促进 IL-12 产生平行，因此可以推测本发明的岩藻依聚糖及其分解产物引起的 IFN- γ 产生增强不是由于静止期 T 细胞的直接刺激引起的诱导，而是抗原呈递反应时对 APC 作用促进 IL-12 产生引起的，以及对由于 APC 与 T 细胞的相互作用处于活化状态的 T 细胞作用诱导的。基于这一点，本发明中使用的岩藻依聚糖及其分解产物显示与发现直接诱导作用的上述报道完全不同的作用。

另外，IFN- γ 在 T 细胞(Th1)的 T 细胞受体被抗原呈递细胞(APC)等刺激时产生，并通过 APC 产生的 IL-12 促进产生。IFN- γ 在病毒、真菌感染以及癌疾病等中具有使 NK 细胞、巨噬细胞等细胞性免疫活化，发挥增强生物防御能力的作用。

另一方面，已知 IFN- γ 能抑制作为以哮喘、花粉病、特异性皮炎等为代表的变态反应疾病的发生原因的 Th2 细胞活化。Th2 细胞诱导免疫球蛋白 E 抗体(IgE)产生。产生的 IgE 与肥大细胞的细胞膜上的受体结合，引起肥大细胞释放化学介质。以这种炎症性介质为出现变态反应症状的直接原因。

本发明的抗变态反应剂在抗原致敏后的口服给药中，抑制 IgE 产生，对于改善发病后的以哮喘、花粉病、特异性皮炎等为代表的

变应性疾病的症状非常有用。

而且，本发明提供含有岩藻依聚糖和/或其分解产物的调节细胞因子生成用食品或饮料、诱导一氧化氮产生用食品或饮料或者抗变态反应用食品或饮料。

5 特别是作为本发明的调节细胞因子生成用食品或饮料，从有效性的观点来看，优选调节白介素类或干扰素类生成用食品或饮料，更优选调节干扰素- γ 或白介素-12生成用食品或饮料。

另外，本发明的抗变态反应用食品或饮料具有抗原致敏后的 IgE 产生抑制作用，通过摄取发挥抗原致敏后的 IgE 产生抑制作用，在
10 这一点上，是非常有用的食品或饮料。因此，作为抗变态反应用食品或饮料，优选抑制 IgE 产生用食品或饮料。

另外，关于后述的饲料，基于同样的观点也优选具有这些作用的饲料。

所述食品或饮料基于其细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生
15 诱导作用、抗变态反应作用，对于改善、预防对岩藻依聚糖或其分解产物显示敏感性的需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病、变应性疾病的症状是非常有用的。

另外，本发明的食品、饮料或饲料、后述化妆品中所谓“含有”
20 这一用语包括含有、添加、稀释的含义，含有是指食品、饮料等中含有本发明使用的有效成分这种状态，添加是指在食品、饮料等的原料中添加本发明使用的有效成分这种状态，稀释是指在本发明使用的有效成分中添加食品、饮料等的原料这种状态。

本发明的食品或饮料的制备方法可以按照公知的方法进行，没有特别的限定。作为所述的制备方法，可以列举烹调、加工以及一
25 般采用的食品或饮料的制备方法，只要制得的食品或饮料中含有具有细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用和抗变态反应作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分即可。

本发明的食品或饮料没有特别的限定，例如含有岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的谷类加工品（小麦粉加工品、淀粉加工品、预混合加工品、面类、通心粉类、面包类、馅类、荞麦面类、
30 麸子、米粉、粉条、包装饼等），油脂加工品（可塑性油脂、油炸用油、色拉油、蛋黄酱类、调味汁等），大豆加工品（豆腐类、豆酱、

纳豆等), 肉类加工品(火腿、熏猪肉、压缩火腿、香肠等), 水产品(冷冻碎鱼肉、鱼糕、鱼卷、鱼肉山芋蒸饼、油炸鱼丸子、余鱼丸子、饭卷、鱼肉火腿、香肠、干狐鲣、鱼子加工品、水产品罐头、煮的鱼贝等), 乳制品(原料乳、乳酪、酸乳、奶油、干酪、炼乳、乳粉、冰淇淋等), 蔬菜·果实加工品(馅类、果酱类、腌菜类、果类饮料、蔬菜饮料、混合饮料等), 糖果类(巧克力、饼干类、甜点类、蛋糕、年糕、米糕类等), 酒精饮料(日本酒、中国酒、葡萄酒、威士忌酒、日本蒸馏酒、伏特加酒、白兰地、杜松子酒、糖蜜酒、啤酒、清凉醇饮料、果酒、利口酒等), 嗜好饮料(绿茶、红茶、乌龙茶、咖啡、清凉饮料、乳酸饮料等), 调料(酱油、辣酱油、醋、料酒等), 罐装、瓶装、袋装食品(牛肉盖饭、小锅什锦饭、红小豆饭、咖喱饭、其它各种烹调好的食品), 半干燥或浓缩食品(肝酱、其它涂抹果酱的食品、荞麦·面条的汁、浓缩的汤类), 干燥食品(速食面类、速食咖喱饭、速溶咖啡、果汁粉、汤粉、速食酱类、烹调好的食品、烹调好的饮料、烹调好的汤等), 冷冻食品(素烧、蒸鸡蛋羹、烤鳗鱼串、汉堡包、烧麦、饺子、各种面条、鸡尾酒等), 固态食品、液态食品(汤等), 香料类等农产·林产加工品、畜牧加工品、水产加工品等。

作为本发明的食品或饮料, 含有具有选自细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用等生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物, 只要含有用于表达其生理作用的必要量即可, 对其形状没有特别的限定, 也包括片状、颗粒状、胶囊状等能够口服摄取的形状。

岩藻依聚糖和/或其分解产物在食品或饮料中的含量可以根据其功能和生理活性适当选择, 例如每100重量份食品为 10^{-9} 重量份以上, 优选 10^{-7} ~2重量份, 例如每100重量份饮料为 10^{-9} 重量份以上, 优选 10^{-7} ~2重量份。另外, 例如成人每天最好摄取岩藻依聚糖和/或其分解产物达到0.01~2000mg/kg。

另外, 具有选自细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用等生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物作为同时具有该生理作用和食物纤维功能的健康食品材料、作为食品或饮料的制造材料是非常有用的。

而且, 按照本发明, 还提供一种含有具有选自细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用等生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的生物用饲料。

另外, 作为本发明的一种方式, 提供将具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物给予生物的生物饲养方法。

另外, 作为本发明的一种方式, 提供含有具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物的生物饲养用剂。

在这些发明中, 生物是指例如养殖动物、宠物等, 作为养殖动物, 例如家畜、试验动物、家禽、鱼类、甲壳类或贝类。

作为饲料, 例如基于岩藻依聚糖和/或其分解产物的生理作用的身体状况改善用饲料。

作为饲养用剂, 例如浸渍用剂、饲料添加剂、饮料用添加剂。

这些发明中, 具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物具有提高生物的营养效率, 例如存活率、养肥率、产卵率、产仔率、断奶率等的效果。

在将岩藻依聚糖和/或其分解产物给予生物的生物饲养方法中, 通常每 1kg 对象生物的体重、每天优选给予具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物 0.01 ~ 2000mg/kg。给药可以通过例如将岩藻依聚糖和/或其分解产物添加、混合到人工配合饲料的原料中, 或与人工配合饲料的粉末原料混合后, 添加、混合到其它原料中进行。另外, 也可以给予本发明的饲料, 使之能够达到所述岩藻依聚糖和/或其分解产物的给药量。

具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物在饲料中的含量没有特别的限定, 可以根据目的使用, 优选 0.001 ~ 15 重量%的比例。

作为人工配合饲料例如以鱼粉、酪蛋白、乌贼粉等动物性原料, 大豆粕、小麦粉、淀粉、饲料用酵母等植物性原料, 鳕鱼肝油、乌贼肝油等动物性油脂, 大豆油、菜籽油等植物性油脂, 维生素类、矿物类、氨基酸、抗氧化剂等为原料的人工配合饲料。另外, 还例如鱼肉绞碎物等鱼类用饲料。

另外, 也可以使用如低聚果糖、低聚异麦芽糖等功能性低聚糖, 如聚葡萄糖、难消化性糊精、 β -1, 3-葡聚糖等食物纤维, 蜂胶,

如麦芽糖醇、palaninitit、赤藓糖醇等糖醇，EPA， γ -亚麻酸，亚铁血红素，小球藻、螺旋藻属、白浆果提取物，如多元酚等止龋材料等功能性食品材料作为本发明饲料的原料。另外，在本发明中作为饲料，也包括饲料添加剂、饲料用营养辅助食品。

5 本发明饲料的制备方法没有特别的限定，只要制得的饲料中含有具有选自细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用等生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物的有效量即可。

另外，也可以通过将具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物直接添加到池塘、水槽、贮水池或饲养区域的水、海水等中，浸渍对象生物给药。这种浸渍方法在对象生物的饲料摄取量低下时特别有效。

水或海水中岩藻依聚糖和/或其分解产物的浓度没有特别的限定，可以根据目的使用，优选0.00001~1重量%的比例。

15 另外，也可以使对象生物摄取含有具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物的饮料作为饲养用饮料。

饮料中具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物的浓度没有特别的限定，可以根据目的使用，优选0.0001~1重量%的比例。

20 以具有所述生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的生物饲养用剂，例如浸渍用剂、饲料添加剂、饮料用添加剂可以按照其本身公知的方法制备。

25 本发明可以适用的生物没有限定，作为养殖动物，例如马、牛、猪、羊、山羊、骆驼、驼羊等家畜，小鼠、大鼠、土拨鼠、兔等实验动物，鸡、鸭、火鸡、鸵鸟等家禽，真鲷、石鲷、比目鱼、鲷鱼、师鱼、黄尾笛鲷、黄条师、金枪鱼、大甲参、香鱼、鲑类、河豚、鳗鲡、泥鳅、鲇鱼等鱼类，对虾、黑虎虾、青蟹等甲壳类等，鲍、螺、扇贝、牡蛎等贝类，作为宠物，例如狗、猫等，可以广泛适用于陆上、水中动物。

30 通过摄取含有具有选自细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用等生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物的饲料，或者将对象生物浸渍在含有该岩藻依聚糖和/或其分解产

物的液体中，能够显著改善家畜、实验动物、家禽、鱼类、甲壳类、贝类、宠物等的身体状况、健康、生物体的体内平衡、新陈代谢等，本发明对于防止生物老化是非常有用的。

而且，具有选自细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用等生理作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物作为化妆品的有效成分是有用的，作为本发明的一种方式，提供以岩藻依聚糖和/或其分解产物为有效成分的调节细胞因子生成用化妆品、诱导一氧化氮产生用化妆品、抗变态反应用化妆品等。

这些化妆品等中含有的岩藻依聚糖和/或其分解产物的含量通常优选为 0.0001~20 重量%，更优选 0.001~5 重量%。

本发明的化妆品对透皮、口服使用有效，按照本发明可以提供通过透皮给药、口服给药有效的化妆品。特别是抗变态反应用化妆品是基于其抗变态反应作用对治疗、预防特应性皮炎有用的化妆品。另外，其给药量或适用量可以适当调节以得到所需的效果。

本发明的化妆品可以按照常规方法制备，作为调节细胞因子生成用化妆品、诱导一氧化氮产生用化妆品、抗变态反应用化妆品，可以制备例如洗剂、乳液、面霜、面膜剂、浴用剂、洗面剂、浴用洗剂、毛发滋养剂、生发剂或洗发剂。

本发明所使用的具有细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用、抗变态反应作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物在给大鼠口服时，确认即使一次口服给药 1g/kg，也没有死亡例。

实施例

以下给出实施例，更具体地说明本发明，但是本发明并不受这些记载的任何限定。另外，实施例中的%表示重量%。

参考例 1

(1) 将 *Kjellmaniella crassifolia* 充分干燥后，用自由粉碎机(奈良机械制作所制)将干燥物 20kg 粉碎。

将氯化钙二水合物(日本曹达社制) 7.3kg 溶解于自来水 900 升中，其次混合 *Kjellmaniella crassifolia* 粉碎物 20kg。通入水蒸气使之由液体温度 12℃ 升温 40 分钟达到液体温度 90℃，接着搅

拌条件下在 90~95℃保温 1 小时,接着冷却,得到冷却物 1100 升。

接着,使用固液分离装置 (West Farrier Separator 公司制 CNA 型),对冷却物进行固液分离,制备约 900 升的固液分离上清液。

使用 DAICEL 公司制 FE10-FC-FUS0382 (级分分子量 3 万),
5 将固液分离上清液 360 升浓缩至 20 升。接着,加入自来水 20 升,再浓缩至 20 升,这种操作进行 5 次,进行脱盐处理,配制源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的萃取液 25 升。

冷冻干燥该溶液 1 升,得到源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖干燥物 13g。

10

(2)将参考例 1-(1)记载的岩藻依聚糖干燥物 7g 溶解于含有 50mM 氯化钠和 10% 乙醇的 20mM 的咪唑缓冲液 (pH8.0) 700ml 中,通过离心分离除去不溶物。用同样的缓冲液将 DEAE-Cellulofine A-800 柱 ($\phi 11.4\text{cm} \times 48\text{cm}$) 平衡化,供给离心分离上清液后,用同样的缓冲液洗涤,按照氯化钠 50mM 至 1.95M 的浓度梯度进行洗脱 (1 级分: 250ml)。用酚硫酸法以及咔唑硫酸法求出总糖量和糖醛酸含量,按洗脱顺序得到级分 43-49、级分 50-55、级分 56-67。接着,通过电透析将这些级分脱盐后进行冷冻干燥,分别由级分 43-49 制得 I 级分 (340mg),由级分 50-55 制得 II 级分 (870mg),由级分 56-
20 67 制得 III 级分 (2.64g)。

图 1 表示源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 DEAE-Cellulofine A-800 柱洗脱曲线。图 1 中纵轴表示按咔唑硫酸法得到的 530nm 处的吸光度 (图中黑圆圈)、按酚硫酸法得到的 480nm 处的吸光度 (图中白圆圈) 以及电导率 (mS/cm: 图中白方块),横
25 轴表示级分序号。

参考例 2

(1)在分别注入了含有葡萄糖 0.25%、蛋白胨 1.0%、酵母提取物 0.05% 的人工海水 (Jamarin Laboratory 公司制) pH8.2 构成的培养基 600ml 并灭菌 (120℃, 20 分钟) 后的 2 升锥形瓶中接种交替单胞菌属 (*Alteromonas* sp.) SN-1009 (FERM BP-5747), 在 25
30 ℃下培养 26 小时,得到种培养液。将含有蛋白胨 1.0%、酵母提取

物 0.02%、下述参考例 2 - (2) 记载的硫酸化多糖 0.2% 以及消泡剂 (信越化学工业社制 KM70) 0.01% 的人工海水 pH8.0 构成的培养基 20 升装入 30 升容量的发酵罐中, 在 120℃ 下杀菌 20 分钟。冷却后, 接种上述种培养液 600ml, 在每分钟 10 升的通气量和每分钟 250 转的搅拌速度的条件下, 在 24℃ 培养 24 小时。培养结束后, 离心分离培养液, 得到菌体和培养上清液。用装有排除分子量 1 万的全纤维的超滤器浓缩得到的培养上清液, 之后用 85% 饱和硫酸铵盐析, 通过离心分离收集生成的沉淀, 对含有十分之一浓度人工海水的 20mM Tris - 盐酸缓冲液 (pH8.2) 充分透析, 配制 600ml 选择性作用于硫酸化多糖的内切型硫酸化多糖分解酶 (F - 岩藻依聚糖特异分解酶) 液。

(2) 用装有直径 1mm 的筛网的切磨机 (增幸产业社制) 将干燥后的 *Kjellmaniella crassifolia* 2Kg 粉碎, 将得到的海带碎片悬浊于 20 升的 80% 乙醇中, 在 25℃ 下搅拌 3 小时, 用滤纸过滤后, 充分洗涤残渣。将得到的残渣悬浊于加热至 95℃ 的 40 升含有 50mM 氯化钠的 20mM 磷酸钠缓冲液 pH6.5 中, 不断搅拌的同时在 95℃ 下处理 2 小时, 提取硫酸化多糖。

过滤提取液中的悬浊物, 制得滤液后, 用 3.5 升 100mM 氯化钠洗涤过滤残渣, 再得到滤液。

将两次的滤液合并后, 将温度降低至 30℃, 添加 3000U 的海藻酸裂合酶 K (Nagase 生化学工业社制) 后, 加入乙醇 4 升, 在 25℃ 下搅拌 24 小时。其次, 进行离心分离, 用具备排除分子量 10 万的全纤维的超滤器将得到的上清液浓缩至 4 升, 再用含有 10% 乙醇的 100mM 氯化钠继续超滤, 直到着色性物质不再过滤。

通过离心分离除去非滤液中生成的沉淀, 将该上清液的温度降低至 5℃, 用 0.5N 盐酸调节 pH 至 2.0 后, 通过离心分离除去生成的蛋白质等沉淀, 迅速用 1N 氢氧化钠将得到的上清液的 pH 调节至 8.0。

其次, 用装有排除分子量 10 万的全纤维的超滤器进行超滤, 用 20mM 氯化钠 pH8.0 完全取代溶剂后, 再调节 pH 至 8.0, 离心分离后, 进行冷冻干燥, 制得约 95g 的硫酸化多糖。

(3) 用装有直径 1mm 筛网的切磨机粉碎干燥的 *Kjellmaniella crassifolia* 2Kg, 将得到的海带碎片悬浊于 20 升的 80% 乙醇中, 在 25℃ 下搅拌 3 小时, 用滤纸过滤后, 充分洗涤残渣。将得到的残渣悬浊于含有 30ml 上述参考例 2-(1) 制得的内切型硫酸化多糖分解酶、10% 乙醇、100mM 氯化钠、50mM 氯化钙以及 50mM 咪唑的 20 升缓冲液 (pH8.2) 中, 在 25℃ 下搅拌 48 小时。用网眼的直径为 32μm 的不锈钢金属网过滤该悬浊液, 用含有 50mM 氯化钙的 10% 乙醇洗涤残渣。再将该残渣悬浊于 10 升含有 50mM 氯化钙的 10% 乙醇中, 搅拌 3 小时后, 用不锈钢金属网过滤, 洗涤。再将该残渣在同样的条件下悬浊后, 搅拌 16 小时, 用直径 32μm 的不锈钢金属网过滤, 洗涤。

收集这样得到的滤液和洗涤液, 用装有排除分子量 3000 的全纤维的超滤器进行超滤, 分离成滤液和非滤液。

用旋转式汽化器将该滤液浓缩至约 3 升后, 离心分离得到上清液。用装有排除分子量 300 的膜的电透析器将得到的上清液脱盐后, 向该溶液中添加醋酸钙达到 0.1M, 离心分离除去生成的沉淀。将该上清液装入预先用 50mM 醋酸钙平衡后的 DEAE-Cellulofine (树脂量 4 升), 用 50mM 醋酸钙和 50mM 氯化钠充分洗涤后, 按 50mM ~ 800mM 氯化钠的浓度梯度进行洗脱。这时的收集量按每 1 级分 500ml 进行。用醋酸纤维素膜电泳法 [Analytical Biochemistry, 第 37 卷, 第 197 ~ 202 页 (1970)] 分析收集的级分, 用氯化钠浓度为约 0.4M 洗脱的硫酸化糖 (级分序号 63 附近) 是均一的。

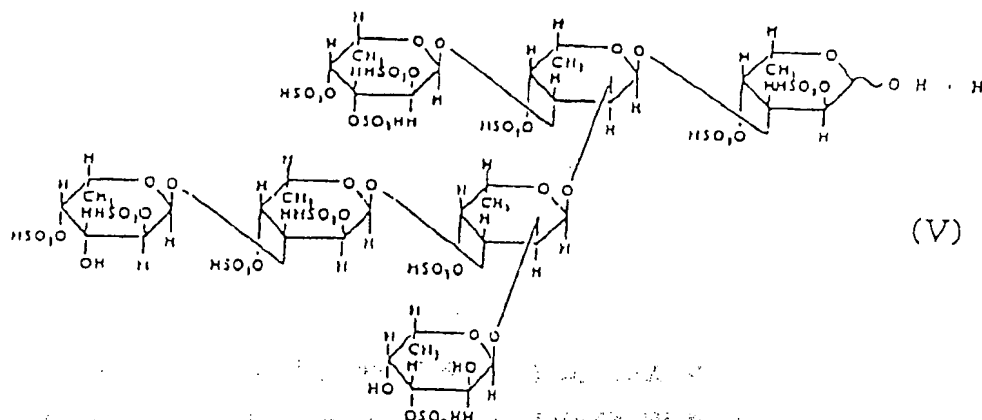
然后, 首先将级分序号 63 的溶液浓缩至 150ml 后, 添加氯化钠使浓度达到 4M, 装入预先用 4M 氯化钠平衡后的 Phenyl-Cellulofine (树脂量 200ml), 用 4M 氯化钠充分洗涤。收集非吸附性的硫酸化糖级分, 用装有排除分子量 300 的膜的电透析器脱盐, 得到脱盐液 505ml。

将得到的脱盐液中 40ml 装入用含有 10% 乙醇的 0.2M 氯化钠平衡后的 Cellulofine GCL-90 柱 (4.1cm × 87cm) 中, 进行凝胶过滤。收集按每 1 级分 9.2ml 进行。

按照酚硫酸法 [Analytical Chemistry, 第 28 卷, 第 350 页

(1956)] 对总级分进行总糖量的分析。

结果, 由于硫酸化糖形成了 1 个峰, 收集其峰的中央部分, 即级分序号 63~70, 用装有排除分子量 300 的膜的电透析器脱盐后, 冷冻干燥, 得到 112mg 下述式 V 表示的化合物的干燥品。



参考例 3

- (1) 用装有孔径 1mm 筛网的切磨机 (增幸产业社制) 粉碎干燥 *Kjellmaniella crassifolia* 2Kg, 在 20 升的 80% 乙醇中 25℃ 下搅拌 3 小时后过滤, 洗涤。将得到的残渣悬浊于含有 50mM 氯化钙、100mM 氯化钠、10% 乙醇以及参考例 2 - (1) 制得的交替单胞菌属 (*Alteromonas* sp.) SN-1009 (FERM BP-5747) 内切型硫酸化多糖分解酶 (F-岩藻依聚糖特异分解酶) 1U 的 20 升 30mM 咪唑缓冲液 (pH8.2) 中, 在 25℃ 下搅拌 2 天, 其次用孔径 32μm 的不锈钢金属网过滤, 洗涤。将得到的残渣悬浊于含有 100mM 氯化钠、10% 乙醇以及 4g 海藻酸裂合酶 (Nagase 生化学工业制) 的 40 升磷酸钠缓冲液 (pH6.6), 在 25℃ 搅拌 4 天后, 离心分离得到上清液。为了除去所得上清液中含有的海藻酸的低分子化物, 用装有排除分子量 10 万的全纤维的超滤器浓缩至 2 升后, 用含有 10% 乙醇的 100mM 氯化钠进行溶液更换。向该溶液中添加等量的 400mM 醋酸钙搅拌后, 离心分离, 将得到的上清液用冰冷却, 同时用 1N 盐酸调节至 pH2。通过离心分离除去生成的沉淀, 用 1N 氢氧化钠将得到的上清液调节至

pH8.0。通过超滤将该溶液浓缩至1升后，用100mM的氯化钠进行溶液交换。通过离心分离除去这时产生的沉淀。为了除去得到的上清液中的疏水性物质，向上清液中加入氯化钠达到1M，装入用1M氯化钠平衡后的3升Phenyl-Cellulofine柱（生化学工业制），收集流出的级分。通过超滤器将该级分浓缩后，用20mM的氯化钠进行溶液交换，冷冻干燥。冷冻干燥物的重量为29.3g。

(2) 将上述冷冻干燥物15g溶解于含有400mM氯化钠以及培养国际公开第97/26896号说明书记载的黄杆菌属(Flavobacterium sp.) SA-0082 (FERM BP-5402) 与参考例2-(1) 同样由该培养物得到的内切型硫酸化多糖分解酶(U-岩藻依聚糖特异分解酶)9U的1.5升50mM Tris-盐酸缓冲液，在25℃下反应6天后，用蒸发器浓缩至约300ml。将浓缩液加入到排除分子量3500的透析管中彻底透析，将残留在透析管内的液体装入用50mM氯化钠平衡后的4升DEAE-Cellulofine A-800中，用50mM氯化钠充分洗涤后，按照50-650mM氯化钠的浓度梯度进行洗脱。再用650mM的氯化钠充分洗脱同一柱。收集洗脱级分中用650mM氯化钠洗脱出的级分作为硫酸化岩藻半乳聚糖级分，用排除分子量10万的超滤器浓缩后，用10mM的氯化钠更换溶液，冷冻干燥得到硫酸化岩藻半乳聚糖的冷冻干燥物0.85g。得到的硫酸化岩藻半乳聚糖(G-岩藻依聚糖)含有半乳糖和岩藻糖作为构成糖，其摩尔比为约2:1。

参考例4

用装有孔径1mm筛网的切磨机粉碎市售的裙带菜(Undaria pinnatifida)干燥物1Kg后，悬浊于10升的80%乙醇中，搅拌3小时后，用滤纸过滤，得到残渣。将残渣悬浊于含有50mM氯化钠的40mM磷酸缓冲液(pH6.5)20升中，在95℃下处理2小时。将处理液冷却至37℃后，添加乙醇达到10%，添加市售的海藻酸裂合酶K(Nagase 生化学工业社制)12000U后，在室温下搅拌24小时。离心分离得到的处理液，用装有排除分子量10万的全纤维的超滤器将该上清液浓缩至2升后，通过离心分离除去生成的沉淀。将得到的上清液冷却至5℃后，添加0.5N盐酸调节pH至2.0后，搅拌30分

钟, 通过离心分离除去生成的沉淀。用 0.5N 氢氧化钠将上清液的 pH 调节至 8.0, 通过超滤将溶液更换为 20mM 的氯化钠。将溶液的 pH 调节至 8.0 后, 将离心分离得到的上清液冷冻干燥, 得到 90.5g 源于裙带菜的岩藻依聚糖。

5

参考例 5

参考例 5

将粉碎的墨角藻 (*Fucus vesiculosus*) 干燥物 1Kg 悬浊于 10 升的 80% 乙醇中, 搅拌 3 小时后, 用滤纸过滤, 得到残渣。将残渣
10 悬浊于含有 100mM 氯化钠的 30mM 磷酸缓冲液 (pH6.0) 30 升中, 在 95℃ 下处理 2 小时。将处理液冷却至 37℃ 后, 添加 100g 活性炭, 搅拌 30 分钟。添加市售的海藻酸裂合酶 K 3000U 后, 添加乙醇至 10%, 在室温下搅拌 24 小时。离心分离得到的处理液, 用装有排除分子量 10 万的全纤维的超滤器将该上清液浓缩至 2 升后, 通过离心分
15 离除去生成的沉淀。向该上清液中加入提取液, 同时进行超滤, 除去色素。将得到的非滤液冷却至 5℃ 后, 添加 0.5N 盐酸调节 pH 至 2.0 后, 搅拌 30 分钟, 通过离心分离除去生成的沉淀。用 0.5N 氢氧化钠将上清液的 pH 调节至 8.0, 通过超滤将溶液更换为 20mM 氯化钠。将溶液的 pH 调节至 8.0 后, 将离心分离得到的上清液冷冻干燥, 得
20 到 71g 源于墨角藻的岩藻依聚糖。

参考例 6

将按照参考例 1 - (1) 记载的方法制得的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖 2g 溶解于 100ml 水中, 用枸橼酸将其 pH
25 调节至 pH3 后, 在 100℃ 下处理 3 小时, 制得该岩藻依聚糖的酸分解产物。通过采用 Cellulofine GCL-300 或 Cellulofine GCL-25 的凝胶过滤对该酸分解产物进行分子量分级, 分级得到分子量大于 25000 (A 级分)、25000~大于 10000 (B 级分)、10000~大于 5000 (C 级分)、5000~大于 2000 (D 级分)、2000~大于 500 (E 级分)、
30 500 以下 (F 级分)。然后, 分别将这些级分和酸分解产物脱盐后进行冷冻干燥, 制得酸分解产物的各级分和酸分解产物。

参考例 7

将刺参 5kg 解剖, 除去内脏, 收集体壁。每 200g 体壁湿重量加入 500ml 丙酮, 用匀浆机处理后过滤, 用丙酮洗涤残渣直到没有更多的着色物质。将该残渣抽滤干燥, 得到 140g 干燥物。向该干燥物中加入 0.4M 食盐水 2.8 升, 在 100℃ 下处理 1 小时后, 过滤。用 0.4M 食盐水充分洗涤残渣, 得到提取液 3.7 升。向该提取液中加入 5% 氯化十六烷基吡啶鎓直到没有沉淀生成, 通过离心分离收集生成的沉淀。将该沉淀悬浊于 0.4M 食盐水中再次离心分离, 向得到的沉淀中添加 1 升 4M 食盐水, 用匀浆机处理后, 搅拌的同时添加 4 升乙醇, 搅拌 1 小时后, 过滤, 得到沉淀。对于该沉淀, 反复进行悬浊于 80% 乙醇中然后过滤的操作, 直到上清液在 260nm 处的吸光度达到 0 为止。将得到的沉淀残渣与 2 升 2M 食盐水中, 通过离心分离除去不溶物。用装有排除分子量 3 万的膜的超滤装置对上清液进行超滤, 完全脱盐后, 冷冻干燥, 得到 3.7g 源于刺参的岩藻依聚糖。

15

参考例 8

将市售的盐腌冲绳海藻 (*Cladosiphon okamuranus*) 625g 悬浊于 4375ml 的 30mM 磷酸钠缓冲液 (pH6.0) 中, 用匀浆机以 8000 转/分钟处理 5 分钟后, 在 95℃ 下处理 1 小时, 离心分离得到上清液。向得到的上清液中加入 10g 活性炭后, 搅拌 30 分钟, 离心分离得到上清液。用装有排除分子量 10 万的全纤维的超滤器将得到的上清液浓缩至 2 升后, 用 20mM 氯化钠更换溶液, 冷冻干燥, 得到 10.9g 源于冲绳海藻的岩藻依聚糖级分的干燥物。

20

25 实施例 1

将 RAW264.7 细胞 (ATCC TIB 71) 悬浊于含有 10% 胎牛血清 (Gibco 公司制)、不含酚红、含有 2mM L-谷氨酰胺 (Life Technologies Oriental 公司制, 25030-149) 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Bio Whittaker 公司制, 12-917F) 中达到 6×10^5 细胞/ml, 向 48 孔微板的孔中分别加入 500 μ l, 在 5% 二氧化碳气体存在下, 在 37℃ 培养 12 小时或 24 小时。向各孔中添加下述试样的各水溶液, 培养上述规定时间后, 测定一氧化氮 (NO) 在培养基中氧化生成的 NO_2^- 浓

30

度。作为试样使用的参考例 1 - (2) 记载的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分和 III 级分、参考例 2 - (3) 记载的式 V 表示的化合物 (以下称为 7-12SFd-F) 添加至最终浓度达到 1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。另外, 对照组添加与试样等量的灭菌蒸馏水。另外, 阳性对照组添加脂多糖 (LPS, Sigma 公司制) 使最终浓度达到 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

上述培养后, 向 100 μl 培养基中加入 100 μl 的 4% 格里斯试剂 (Sigma 公司制, G4410), 室温下放置 15 分钟后, 测定 540nm 处的吸光度, 根据由预先按照已知浓度溶解于上述培养基中的 NaNO_2 制作的标准曲线计算出培养基中的 NO_2^- 浓度。测定均进行 3 次。

结果得知 7-12SFd-F、源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分和 III 级分均促进诱导产生 NO, 具有免疫激活作用。其结果如图 2~图 5 所示。也就是说, 图 2 是表示添加 7-12SFd-F 培养时培养基中 NO_2^- 浓度的图, 图 3 是表示添加 I 级分培养时培养基中 NO_2^- 浓度的图, 图 4 是表示添加 II 级分培养时培养基中 NO_2^- 浓度的图, 图 5 是表示添加 III 级分培养时培养基中 NO_2^- 浓度的图。另外, 图 6 是表示添加阳性对照的 LPS 培养时培养基中 NO_2^- 浓度的图。在图 2~图 6 中, 横轴表示培养条件, 纵轴表示 NO_2^- 浓度 (μM)。

根据这些结果, 得知源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分、III 级分以及 7-12SFd-F 具有 NO 产生诱导作用以及基于该作用的免疫激活效果。

另外, 各参考例记载的其它岩藻依聚糖及其分解产物也显示同样的 NO 产生诱导作用。

另外, 使用 ELISA 试剂盒 (Genzyme 公司) 对与测定 NO_2^- 浓度的培养液相同的培养液中的 IFN- γ 量进行测定。但是, 在该系统中源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分、III 级分、7-12SFd-F 以及其它各参考例记载的岩藻依聚糖及其分解产物均未见诱导 IFN- γ 产生。

实施例 2

(1) 来自非刺激淋巴细胞的 IFN- γ 产生诱导作用

由日本 SLC 购入 ICR 小鼠 (雌性, 7 周龄, 体重约 25g), 预饲养 1 周后, 用于实验。由小鼠摘出脾脏, 细粉碎后, 悬浊于含有 10% 胎牛血清 (Hyclone 公司) 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司) 中, 得到单细胞液。使粘连性细胞粘附在塑料培养皿上除去, 以非粘连性细胞作为脾脏淋巴细胞使用。将脾脏淋巴细胞悬浊于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 调节至 2×10^6 细胞/ml, 按 180 μ l/孔接种在 96 孔微板上。将各试样溶解于蒸馏水, 调节至 100mg/ml 的浓度, 用培养基稀释至显示量的 10 倍浓度。对照组添加与试样等量的培养基, 向对照组以外的各孔中添加各种浓度 (10~500 μ g/ml) 的参考例记载的各种岩藻依聚糖、Kjellmaniella crassifolia 岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分、III 级分、7-12SFd-F 或 100 μ g/ml 的刀豆球蛋白 A (Con A, Nakalaitesque 公司) 溶液 20 μ g/ml, 在 37℃、5% 二氧化碳培养器中培养 2 天或 4 天。培养后, 回收培养上清液, 使用 ELISA 试剂盒 (Genzyme 公司) 测定 IFN- γ 量。

结果, 参考例记载的各种岩藻依聚糖、源于 Kjellmaniella crassifolia 的岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分、III 级分、7-12SFd-F 确认采用 500 μ g/ml 以下的用量时没有来自非刺激淋巴细胞的 IFN- γ 产生诱导作用。另一方面, 添加 Con A 的细胞确认有较强的 IFN- γ 产生诱导。

(2) 同种异源抗原刺激下的 IFN- γ 产生诱导作用

由日本 SLC 购入 BALB/c 小鼠 (雌性, 6 周龄, 体重约 20g)、C57BL/6 小鼠 (雌性, 6 周龄, 体重约 20g), 预饲养 1 周后, 用于实验。由 H-2 单元型不同的小鼠 (BALB/c: H-2d、C57BL/6: H-2b) 摘出脾脏, 通过上述方法得到脾脏淋巴细胞。将各细胞浮游液的细胞浓度调节至 2×10^6 细胞/ml, 分别在 96 孔微板上接种 100 μ l。在该对照组以外的各孔中与实施例 2-(1) 同样添加各种浓度 (10~500 μ g/ml) 的参考例记载的各种岩藻依聚糖、源于 Kjellmaniella crassifolia 的岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分、III 级分、7-12SFd-F 或 10 μ g/ml 的 ConA。另外, 对照组添加与试样等量的培养基。将其在 37℃、5% 二氧化碳培养器中培养 4 天。培养后, 回收培养

上清液, 使用 ELISA 试剂盒测定 IFN- γ 量。

结果, 参考例记载的各种岩藻依聚糖、源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分、III 级分、7-12SFd-F 确认采用 500 μ g/ml 以下的用量时对同种异源抗原刺激状态的淋巴细胞没有 IFN- γ 产生诱导作用。另一方面, 添加 Con A 的细胞确
5 认有较强的 IFN- γ 产生诱导。

(3) 致敏淋巴细胞的抗原刺激下的 IFN- γ 产生诱导作用

由日本 SLC 购入 C57BL/6 小鼠 (雌性, 6 周龄, 体重约 20g),
10 预饲养 1 周后, 用于实验。将 1×10^6 细胞的 Meth-A 小鼠肉瘤细胞接种在小鼠的腹腔内, 进行免疫。肿瘤接种 14 天后摘出脾脏, 通过上述方法得到脾脏淋巴细胞。将细胞浮游液的细胞浓度调节至 2×10^6 细胞/ml, 分别在 96 孔微板上接种 100 μ l。为了制备刺激细胞, 向悬浊于 RPMI-1640 培养基中调节至 2×10^6 细胞/ml 的 Meth-A 小鼠
15 肉瘤细胞中以 50 μ g/ml 的浓度添加丝裂霉素 C (协和发酵社制), 在 37 $^{\circ}$ C 下处理 30 分钟, 洗涤 2 次后, 悬浊于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 调节至 2×10^6 细胞/ml。将制得的刺激细胞续加到按 100 μ l/孔加有脾脏淋巴细胞的板的各孔中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养器中培养 4 天。与实施例 2-(1) 同样配制、添加使源于
20 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖达到 1~100 μ g/ml, 使源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 I 级分、II 级分、III 级分、7-12SFd-F 分别达到 10~500 μ g/ml, 另外阳性对照使 ConA 达到 10 μ g/ml, 同样进行培养。另外, 对照组添加与试样等量的培养基。培养后, 回收培养上清液, 用 ELISA 试剂盒测定 IFN- γ
25 量。对于同一培养上清液, 使用 ELISA 试剂盒 (ENDOGEN 公司) 测定 IL-12 量。

其结果如图 7 和图 8 所示。也就是说, 图 7 是表示岩藻依聚糖及其分解产物的 IFN- γ 产生诱导作用的图, 图中纵轴表示 IFN- γ 产生量 (pg/ml), 横轴表示各试样以及添加量 (μ g/ml)。

30 另外, 图 8 是表示岩藻依聚糖及其分解产物的 IL-12 产生诱导作用的图, 图中纵轴表示 IL-12 产生量 (pg/ml), 横轴表示各试样以及添加量 (μ g/ml)。

如图 7、图 8 所示,在致敏淋巴细胞的抗原刺激下,源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖按 1~100 μ g/ml 的用量, I 级分、II 级分、III 级分和 7-12SFd-F 按 10~500 μ g/ml 的用量显示用量依存的 IFN- γ 和 IL-12 产生增强作用。另外,其它各参
5 考例记载的岩藻依聚糖及其分解产物也显示同样的作用。

实施例 3

由日本 SLC 购入 C57BL/6 小鼠(雌性,7 周龄,体重约 20g), 预饲养 1 周后,用于实验。由小鼠摘出脾脏,细粉碎后,悬浊于含
10 有 10% 胎牛血清(Hiclone 公司)的 RPMI-1640 培养基(Bio Whittake 公司)中,得到单细胞液。将脾脏淋巴细胞悬浊于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,调节至 3×10^6 细胞/ml,向 T25 烧瓶(Iwaki 公司)中加入 10ml。分别准备 2 个同样的烧瓶,一个仅添加培养基,另一个还添加源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖使之
15 达到 10 μ g/ml,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下培养。

从开始培养 10 天后回收细胞,用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基稀释到规定浓度,向 96 孔圆底微板中分别注入 100 μ l。

关于细胞的细胞毒性,以 ⁵¹Cr 标记的 EL4 胸腺肿瘤细胞(以下称为 EL4 细胞)作为靶细胞,测定游离到培养上清液中的 γ 射线量。
20 也就是说,向 EL4 细胞中加入铬-51 放射性核素(Chromium-51 Radionuclide)(New England Nuclear 公司)1850kBq,在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时,通过离心分离用 RPMI-1640 培养基洗涤 3 次。将该细胞悬浊于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,调节至 1×10^5 细胞/ml。在上述 96 孔圆底微板中分别注入 100 μ l,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂
25 存在下培养 5 小时,采集上清液 100 μ l 后,用 γ 射线闪烁计数器测定游离的 γ 射线量。如下所示计算出细胞毒性。

$$\text{细胞毒性(\%)} = \left[(\text{实验值} - \text{对照值}) / (\text{总放射活性值} - \text{对照值}) \right] \times 100$$

30 这里,总放射活性值表示使用 0.1% Triton-X 100 μ l 代替培养脾细胞时的 γ 射线量。另外,对照值表示用培养基 100 μ l 代替培养脾细胞时的 γ 射线量,实验值表示使用培养脾细胞时的 γ 射线量。

其结果如图 9 所示。也就是说, 图 9 是表示源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖对小鼠脾脏淋巴细胞的细胞毒性免疫增强作用的图, 纵轴表示细胞毒性 (%), 横轴表示对照的效应细胞和添加参考例 1 记载的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖达到 10 μ g/ml 进行培养得到的效应细胞 (E) 与靶细胞 (T) 的比 (E/T 比)。条形图表示每组 5 只的平均值和标准误差。

如图 9 所示, 小鼠的培养脾细胞 (效应细胞) 对 EL4 细胞 (靶细胞) 显示细胞毒性 (对照)。加入岩藻依聚糖达到 10 μ g/ml 进行培养得到的细胞对 EL4 细胞的细胞毒性增强, 岩藻依聚糖添加组尽管效应细胞和靶细胞的比低, 仍显示高细胞毒性, 因而岩藻依聚糖增强了细胞毒性免疫。

另外, 参考例记载的其它各种岩藻依聚糖、其分解产物、I 级分、II 级分、III 级分以及 7-12SFd-F 也显示同样的活性。

15 实施例 4

(1) 来自非刺激淋巴细胞的 IFN- γ 产生诱导作用

由日本 SLC 购入 C57BL/6 小鼠 (雌性, 6 周龄, 体重约 20g), 预饲养 1 周后, 用于实验。向接种了按上述方法制得的脾脏淋巴细胞的微板各孔中添加参考例 3-(2) 制得的 G-岩藻依聚糖达到 10~500 μ g/ml, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养器中培养 4 天。培养后, 回收培养上清液, 使用 ELISA 试剂盒测定 IFN- γ 量。

其结果, 确认在所讨论的用量下没有 G-岩藻依聚糖产生的 IFN- γ 产生诱导作用。

25 (2) 致敏淋巴细胞的抗原刺激下的 IFN- γ 产生诱导作用

由日本 SLC 购入 C57BL/6 小鼠 (雌性, 6 周龄, 体重约 20g), 预饲养 1 周后, 用于实验。作为试样, 将参考例 3-(2) 制得的 G-岩藻依聚糖溶解于蒸馏水, 配制成 100mg/ml, 用培养基稀释至显示量的 10 倍浓度。向接种了按照上述方法制得的脾脏淋巴细胞以及 Meth-A 小鼠肉瘤细胞的微板各孔中添加 G-岩藻依聚糖, 使最终浓度达到 10~500 μ g/ml, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养器中培养 4 天。另外, 对照组添加与试样等量的培养基, 进行培养。培养后, 回收

培养上清液, 用 ELISA 试剂盒测定 IFN- γ 量和 IL-12 量。

其结果如图 10 和图 11 所示。也就是说, 图 10 是表示 G-岩藻依聚糖的 IFN- γ 产生诱导作用的图, 图中纵轴表示 IFN- γ 产生量 (pg/ml), 横轴表示试样以及添加量 ($\mu\text{g/ml}$)。另外, 图 11 是表示 G-岩藻依聚糖的 IL-12 产生诱导作用的图, 图中纵轴表示 IL-12 产生量 (pg/ml), 横轴表示试样以及添加量 ($\mu\text{g/ml}$)。如图 10、图 11 所示, 在致敏淋巴细胞的抗原刺激下, G-岩藻依聚糖按 10~500 $\mu\text{g/ml}$ 的用量具有用量依存的 IFN- γ 产生增强作用。对于 IL-12 也确认按 500 $\mu\text{g/ml}$ 的用量具有显著的产生增强作用。

10

实施例 5

抗 IL-12 抗体和抗副刺激受体 (CD28、CD40) 抗体对源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的 IFN- γ 产生诱导作用的作用

15

混合按照上述方法制得的源于 C57BL/6 小鼠的脾脏淋巴细胞以及 Meth-A 小鼠肉瘤细胞, 接种在 96 孔微板上, 向所有孔中添加终浓度 100 $\mu\text{g/ml}$ 的参考例 1-(1) 制得的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖。而且, 向对照组以外的孔中添加终浓度 1 $\mu\text{g/ml}$ 的抗 IL-12 抗体 (R&D 公司) 或者终浓度 10 $\mu\text{g/ml}$ 的抗 CD28 抗体或抗 CD40 抗体, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养器中培养 4 天。培养后, 回收培养上清液, 用 ELISA 测定 IFN- γ 量以及 IL-12 量。其结果如图 12 所示。也就是说, 图 12 表示各种抗体对岩藻依聚糖的 IFN- γ 或 IL-12 产生诱导作用的作用, 图中左纵轴表示 IFN- γ 产生量 (pg/ml), 右纵轴表示 IL-12 产生量 (pg/ml), 横轴表示使用的各种抗体。

20

25

如图 12 所示, 抗原呈递反应时源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖引起的 IL-12 的产生诱导被抗 IL-12 抗体、抗 CD28 抗体或抗 CD40 抗体完全抑制。另一方面, 来自致敏淋巴细胞的 IFN- γ 产生诱导被抗 IL-12 抗体抑制约 50%, 被抗 CD28 抗体或抗 CD40 抗体完全抑制。

30

实施例 6

各种岩藻依聚糖的 IFN- γ 产生诱导作用的比较

给 C57BL/6 小鼠接种 Meth-A 小鼠肉瘤细胞进行免疫, 接种 24 天后摘出脾脏。混合按照上述方法制得的源于 C57BL/6 小鼠的脾脏淋巴细胞以及 Meth-A 小鼠肉瘤细胞, 接种在 96 孔微板上。作为试样, 使用参考例 1 制得的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖、参考例 8 制得的源于冲绳海藻的岩藻依聚糖、参考例 5 制得的源于墨角藻的岩藻依聚糖和参考例 4 制得的源于裙带菜的岩藻依聚糖, 与实施例 2-(1) 同样进行配制、添加, 使各种岩藻依聚糖的最终浓度达到 10~500 μ g/ml, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养器中培养 4 天。另外, 对照组添加与试样等量的培养基, 进行培养。培养后, 回收培养上清液, 用 ELISA 试剂盒测定 IFN- γ 量。

其结果如图 13 所示。也就是说, 图 13 是表示各种岩藻依聚糖的 IFN- γ 产生诱导作用的图, 图中纵轴表示 IFN- γ 生产量 (pg/ml), 横轴表示各试样和添加量 (μ g/ml)。

如图 13 所示, 关于致敏淋巴细胞的抗原刺激下的 IFN- γ 产生诱导能力, 确认源于 *Kjellmaniella crassifolia* 与墨角藻的岩藻依聚糖具有同等的 IFN- γ 产生诱导作用, 冲绳海藻、裙带菜具有较弱的 IFN- γ 产生诱导作用。

20 实施例 7

对每组 4 或 5 只的 5 周龄 Wistar 系雄性大鼠 (日本 SLC 社) 腹腔给予蛋清蛋白 (Sigma 公司) 的 0.01% 生理盐水溶液 100 μ l 以及明矾 (商品名: Imject Alum, Pierce 公司) 100 μ l, 致敏, 14 天后由腹腔静脉采集血液。

采集的血液离心分离 (2000rpm, 5 分钟) 后, 分离血浆, 通过使用大鼠的被动皮肤过敏症 (PCA) 反应测定抗原特异性 IgE 量。也就是说, 使用生理盐水制备血浆的 2 倍至 64 倍梯度稀释系列, 分别给剔毛后的 7 周龄 Wistar 系雄性大鼠的背部真皮内注射 0.1ml。真皮内注射 48 小时后, 由尾静脉注射 0.05% 蛋清蛋白和 0.5% 伊凡斯蓝 (Nakalaitesque 公司制) 的混合溶液 1ml。尾静脉注射 30 分钟后, 断头、放血处死大鼠, 观察背部出现的青色斑点, 以直径为 5mm 以上的斑点为阳性, IgE 效价用最高稀释倍数表示。

参考例 1 - (1) 制得的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的给药组从抗原致敏日 7 天前至采血日将 0.1% 或 1% 的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖装入给水瓶中, 使之自由摄取。另外, 对照组同样给予自来水。结果, 通过饮水摄取 1 % 源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖显著抑制蛋清蛋白致敏引起的抗原特异性 IgE 量上升。其结果如表 1 所示。

表 1

	动物 No.	IgE 抗体效价
对照	1	8
	2	64
	3	16
	4	16
	5	32
源于 <i>Kjellmaniella</i> <i>Crassifolia</i> 的 岩藻依聚糖 0.1%	1	8
	2	32
	3	32
	4	32
源于 <i>Kjellmaniella</i> <i>Crassifolia</i> 的 岩藻依聚糖 1%	1	< 2
	2	< 2
	3	< 2
	4	4
	5	8

10

实施例 8

对于按照与实施例 7 同样的方法致敏的大鼠, 在初次致敏 19 天后在相同条件下追加免疫, 最终免疫 14 天后由腹腔静脉采集血液。采集的血液与上述同样通过 PCA 反应测定抗原特异性 IgE 量。

参考例 1 - (1) 制得的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖的给药组从追加免疫日至采血日将 0.1% 或 1% 的源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖装入给水瓶中, 使之自由摄取。另外, 对照组同样给予自来水。结果, 通过饮水摄取 1% 源于 *Kjellmaniella crassifolia* 的岩藻依聚糖显著抑制蛋清蛋白引起的抗原特异性 IgE 量上升。由此表明岩藻依聚糖除了预防性给予, 即使从抗原致敏时治疗性给予, 也是有效的。其结果如表 2 所示。

10 表 2

	动物 No.	IgE 抗体效价
对照	1	8
	2	32
	3	32
	4	32
	5	32
源于 <i>Kjellmaniella</i> <i>Crassifolia</i> 的 岩藻依聚糖 0.1%	1	16
	2	16
	3	32
	4	32
源于 <i>Kjellmaniella</i> <i>Crassifolia</i> 的 岩藻依聚糖 1%	1	2
	2	2
	3	2
	4	4
	5	2

实施例 9

(1)配合原料,使1.5g中含有作为岩藻依聚糖的源于Kjellmaniella crassifolia的岩藻依聚糖20mg,作为多元酚的市售苹果提取物(商品名:Applephenon, Nikka Whisky(株)制)、葡萄籽提取物(商品名:Gravinol, KIKKOMAN(株)制)、甜茶提取物(商品名:Sunten-cha S, SUNTORY(株)制)合计82mg,其余为牛肉提取物(大日本制药(株)制)、啤酒酵母(KIRIN啤酒(株)制)、乳糖、玉米淀粉(加藤化学(株)制)、还原麦芽糖(东和化成工业(株)制),使用挤出造粒机制造本发明的饲料添加物(直径1mm),一包为1.5g。

10

(2)大型犬(体重约30kg)的场合1日3包,中型犬(体重约10kg)的场合1日2包,小型犬(体重约5kg)的场合1日1包,分别在饲料中添加上述饲料添加剂作为营养辅助食品。

通过摄取本发明的饲料添加剂,大型犬、中型犬、小型犬均变得活跃,食欲也增加了。另外,基于身体状况的改善效果,毛色得以改善,体臭、粪尿的臭味减轻。特别是对于老犬可明显见到这些效果,本发明的饲料对于改善老犬的身体状况、恢复健康、恢复青春是非常有用的。

20 保藏的生物材料

(1) 保藏机构的名称

通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所

日本国茨城县筑波市东1丁目1番3号(邮政编码305-

8566)

25 (2) 保藏的微生物

(i) 交替单胞菌属(Alteromonas sp.) SN-1009

原保藏日 : 平成8年2月13日

移送至国际保藏的请求日: 平成8年11月15日

保藏号 : FERM BP-5747

30 (ii) 黄杆菌属(Flavobacterium sp.) SA-0082

原保藏日 : 平成7年3月29日

移送至国际保藏的请求日: 平成8年2月15日

保藏号

: FERM BP - 5402

工业实用性

按照本发明提供一种含有显示细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用和抗变态反应作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的对需要调节细胞因子生成的疾病、需要产生一氧化氮的疾病以及变应性疾病有效的药物。该药物具有调节生物体内白介素类、干扰素类等生成的活性，作为癌、免疫性疾病等必须调节细胞因子生成的疾病的治疗剂或预防剂有用。

另外，特别是作为需要使用这些药物作为 IFN- γ 产生调节剂、IL-2 产生调节剂、NO 产生诱导剂的疾病的治疗剂有用。

有时不必要状态下的免疫系统活化或增强会引起变态反应、自身免疫疾病等疾病，但本发明制剂引起的细胞因子增强、免疫增强是选择性的，仅仅在病毒感染或癌等体内存在应排除的抗原且必需增强细胞性免疫时作用，因而本发明的制剂对于生物防御非常有用。

另外，本发明的制剂能抑制过剩的体液性免疫活化，本发明的制剂对于抑制变态反应也非常有用。

而且，能够使用具有细胞因子生成调节作用、一氧化氮产生诱导作用和抗变态反应作用的岩藻依聚糖和/或其分解产物制备饮食品或饲料，通过作为日常的饮食品摄取，能够改善需要调节细胞因子生成的疾病、如动脉硬化等需要产生一氧化氮的疾病、变应性疾病等的症状等。

因此，以岩藻依聚糖和/或其分解产物作为有效成分的功能性饮食品或饲料由于这些生理作用，是对于维持生物的体内平衡有用的功能性饮食品或饲料。

另外，还提供一种细胞因子生成调节剂，该调节剂对于研究细胞因子类的功能、筛选与细胞因子有关的疾病用药物是有用的。